



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 5/08, A61L 15/32, 27/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/06179 (43) Date de publication internationale: 16 avril 1992 (16.04.92)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR91/00773</p> <p>(22) Date de dépôt international: 2 octobre 1991 (02.10.91)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 90/12135 2 octobre 1990 (02.10.90) FR</p> <p>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): IMEDEX S.A. [FR/FR]; PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : TINOIS, Estelle [FR/FR]; Tour A, 41, chemin de la Raude, F-69160 Tassin-La-Demi-Lune (FR). TIOLLIER, Jérôme [FR/FR]; 41, quai Jäyr, F-69009 Lyon (FR). DUMAS, Henri [FR/FR]; 10, avenue de Menival, Bât. 11-A, F-69005 Lyon (FR). TARDY, Michel [FR/FR]; 165 bis, rue Joliot-Curie, F-69005 Lyon (FR).</p>	<p>(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, boulevard des Batignolles, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: BIOMATERIAL BASED ON COLLAGEN AND ITS APPLICATIONS</p> <p>(54) Titre: BIOMATERIAU A BASE DE COLLAGENE ET SES APPLICATIONS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The biomaterial based on collagen is comprised of the following intimately associated constitutive elements: a dermic substitute or support based on collagen of type IV and an epidermic epithelium with differentiated cells and which is obtained by culture of epidermic cells on said dermic substitute or support. Said biomaterial finds applications in in vitro tests in toxicology, pharmacology or cosmetics or as a protection for wounds and burns or as a healing agent.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>Le biomatériau à base de collagène comporte, intimement associés, un support ou substitut dermique à base de collagène de type IV et un épithélium épidermique à cellules différenciées obtenu par culture de cellules épidermiques sur ledit support ou substitut dermique. Ce biomatériau trouve des applications dans des tests in vitro en toxicologie, pharmacologie ou cosmétologie ou comme protection des plaies et brûlures ou comme agent de cicatrisation.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SU ⁺	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

⁺ Toute désignation de "SU" produit ses effets dans la Fédération de Russie. On ignore encore si une telle désignation produit ses effets dans les autres Etats de l'ancienne Union soviétique .

Biomatériau à base de collagène et ses applications.

La présente invention concerne un biomatériau à base de collagène et des applications de celui-ci.

Au cours des vingt dernières années, des progrès majeurs ont été réalisés dans le domaine de la culture de
5 cellules épidermiques. Ces progrès ont permis la culture d'un nombre croissant de cellules (références bibliographiques 1 et 2) et ont fourni des indications importantes sur les facteurs régulant la croissance et la différenciation terminale de l'épiderme. Différents systèmes
10 ont été développés qui permettent de moduler à la fois la croissance et la différenciation (2, 3, 4). Afin d'étudier davantage la régulation de ces phénomènes biologiques dans le dessein d'étudier les interactions derme-épiderme et de reconstituer un tissu analogue à la peau, on a cultivé des
15 cellules sur des substituts dermiques plus ou moins complexe (références 5 à 13). Du fait de la faible capacité de fixation des kératinocytes sur le substitut dermique, la formation de la membrane basale in vitro a fait l'objet de nombreux travaux. Les seuls résultats publiés au sujet de la
20 reconstitution d'une membrane basale presque complète par des kératinocytes humains dispersés en culture sur du collagène ont fait état de cultures de longue durée (40 à 60 jours) (14, 15). Des auteurs ont rapporté le rôle du collagène de type IV dans la culture des kératinocytes (22,

23, 24).

Par ailleurs, on a déjà réalisé (EP-A-0.357.755) un patch de chirurgie viscérale formé de deux couches de collagène superposées et associées intimement, à savoir une
5 couche poreuse de collagène fibreux et un film de collagène, le collagène pouvant notamment être de type III + I ou de type IV.

La présente invention a pour objectif de fournir un biomatériau comportant des cellules épidermiques
10 différenciées et notamment un biomatériau de ce type dont la structure se rapproche sensiblement de celle de la peau.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un biomatériau utile en pharmacologie, toxicologie et cosmétologie et/ou pour la protection de plaies, brûlures ou
15 la cicatrisation.

La déposante a trouvé de façon surprenante qu'une matrice de collagène de type IV permettait la culture de cellules épidermiques, notamment de kératinocytes, en jouant le rôle d'un support ou substitut dermique et d'obtenir très
20 rapidement un biomatériau dont la structure générale est proche de celle de la peau avec, notamment, formation de ce qu'on peut assimiler à une membrane basale et de cellules cornées.

L'invention a donc pour objet un biomatériau à base
25 de collagène, comportant, intimement associés, un support ou substitut dermique à base de collagène de type IV et un épithélium épidermique à cellules différenciées obtenu par culture de cellules épidermiques sur ledit support ou substitut.

30 De façon avantageuse, le support ou substitut dermique peut comporter en outre une sous-couche de collagène de type I + III sous la forme d'un treillis

poreux.

Les collagènes mis en oeuvre peuvent être réticulés ou natifs ou peuvent être un mélange approprié de collagène natif et de collagène réticulé.

5 Le collagène de type IV peut être notamment d'origine placentaire et préparé selon le brevet EP-A-0.214.035.

De préférence, les cellules épidermiques de colonisation sont des kératinocytes, notamment des kératinocytes humains normaux d'adulte (KHNA).

10 L'épithélium de ce biomatériau présente notamment les caractéristiques suivantes :

a) à partir de 6 jours de culture, une bonne reconstitution des structures d'ancrage au niveau de la jonction dermo-épidermique : nombreux hémidesmosomes bien individualisés (plaque d'ancrage avec tonofilaments s'y insérant, plaque dense sous-basale, filaments d'ancrage) et une déposition en bande, régulière, de matériel extracellulaire entre la surface du collagène de type IV et la membrane plasmique ressemblant à une lamina densa.

20 b) 3 compartiments cellulaires :

- une assise de cellules basales,
- plusieurs assises de cellules intermédiaires reliées entre elles par des desmosomes, contenant des grains de kératohyaline pour les plus superficielles d'entre elles,
- 25 - un stratum corneum.

L'invention a également pour objet l'application de ce biomatériau à des tests pharmacologique, toxicologique ou cosmétologique, notamment sous forme d'un kit d'évaluation in vitro.

30 L'invention a encore pour objet l'application de ce biomatériau à la protection/cicatrisation de plaies et

brûlures.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'un procédé de préparation d'un biomatériau selon l'invention et d'essais in vitro et in vivo.

5 Préparation des collagènes.

La préparation du collagène IV, natif ou oxydé, est réalisée suivant le procédé décrit dans le brevet EP-A-O.214.035.

Les collagènes de type I et III peuvent être préparés
10 selon tout procédé connu.

Préparation du substitut dermique.

Le substitut dermique comporte des collagènes de type I + III oxydés et lyophilisés, recouverts par une couche d'un mélange de collagène de type IV et de collagène de type
15 IV oxydé. Pour la préparation du substitut dermique, on a ajouté une solution d'acide periodique (concentration finale 0,002 M) à une solution à 10 mg/ml de collagènes de type I et de type III dans de l'acide hydrochlorique 0,01 N. Les collagènes oxydés ont été récupérés par précipitation au
20 phosphate (Na_2HPO_4). Le précipité a été lavé plusieurs fois avec un tampon phosphate (Na_2HPO_4) et récupéré par filtration sur une toile de Nylon. Le produit obtenu a été mis sous forme de feuilles, lyophilisé et comprimé. L'oxydation induite par l'acide periodique conduit à la
25 formation d'une matrice de collagène réticulé (brevet US-4.931.546).

On a réalisé une solution de collagène oxydé de type IV (IVox) en ajoutant de l'acide periodique (concentration finale 0,02 M) à une solution à 20 mg/ml de collagène de
30 type IV dans de l'acide hydrochlorique 0,01 N. Après 2 heures d'incubation, le collagène de type IVox a été dialysé contre de l'acide hydrochlorique 0,01 N.

Un mélange formé de 10 mg/ml d'une préparation de collagène de type IV et de 10 mg/ml d'une préparation de collagène de type IV oxydé (4:1) (IV/IVox) a été déposé à la surface de l'éponge de collagène de type I + III, puis a été
5 séché. La stérilisation du substitut dermique a été réalisée par irradiation gamma (25 kgray).

Culture de KHNA (kératinocytes humains normaux d'adulte).

On a préparé des suspensions de cellules épidermiques
10 humaines par des procédés standards de trypsination à partir d'échantillons de peau d'adultes normaux prélevés lors d'opérations de chirurgie plastique. Les cellules ont été propagées sur des couches de cellules nourricières 3T3 gamma-irradiées, selon le procédé de H. Green (1).

15 Le milieu de culture était le DMEM (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) et HAM F12 (Gibco) (3:1) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (Boehringer Mannheim, Meylan, France), $1,8 \cdot 10^{-4}$ M d'adénine, $5 \mu\text{g/ml}$ d'insuline, $2 \cdot 10^{-9}$ M de triiodothyronine, $5 \mu\text{g/ml}$ de transferrine, $0,4 \mu\text{g/ml}$ d'hydrocortisone, 10^{-10} M de toxine
20 cholérique et 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique, tous obtenus de SIGMA, USA (milieu complet). A confluence, les kératynocytes ont été trypsinés et stockés dans de l'azote liquide. Des échantillons circulaires de substitut
25 dermique, de 1,6 cm de diamètre, ont été placés dans des plaques de culture à 24 puits (Falcon) et ont été comprimés pour adhérer à la matière plastique. Des kératinocytes en suspension ont étéensemencés directement sur ces
30 échantillons et mis en contact d'un milieu de culture (on aensemencé $5 \cdot 10^4$ cellules par cm^2 de façon à obtenir la confluence en 4 jours). Les cultures ont été incubées à 37°C en atmosphère à 5 % de CO_2 et le milieu de culture a été

changé tous les deux jours. Lorsque la confluence des cellules épidermiques a été atteinte, on a retiré le substitut de peau obtenu pour un examen sous microscope ou pour transplantation chez la souris. Des substituts dermiques ont été placés, 5 jours après mise sur plaque, sur des grilles en acier de façon à amener la culture de kératynocytes à l'interface air-liquide. Les cellules sont ensuite exposées à l'air et alimentées à travers le substitut dermique.

La partie supérieure du substitut dermique est une couche de collagène de type IV-IVox. Pour étudier la capacité du biomatériau à permettre la croissance de cellules épidermiques, on a cultivé des KHNA sur une couche transparente analogue de collagène IV-IVox réalisée sur des plaques à 6 puits, de façon à permettre une observation microscopique directe. Les cellules ont étéensemencées en suspension sur les couches dans un milieu complet ou dans un milieu sans sérum. Le milieu sans sérum était du DMEM et du HAM F12 (1:1) (Gibco) supplémenté avec 0,5 µg/ml d'hydrocortisone, 5 µg/ml d'insuline, $3 \cdot 10^{-8}$ M de sélénite (SIGMA), 5 µg/ml de transferrine, 1 mg/ml d'albumine (Institut Mérieux, Lyon, France), 5 µg/ml de fibronectine (Institut Mérieux). De fortes densités d'ensemencement, 10^5 , $5 \cdot 10^4$, $3 \cdot 10^4$ cellules/cm², ont été testées dans un milieu complet et une faible densité d'ensemencement, $8 \cdot 10^3$ cellules/cm², dans du milieu sans sérum.

Différenciation des cellules épidermiques.

Pour l'histologie, les échantillons ont été fixés dans un milieu de fixation de Bouin, déshydratés dans l'alcool et enrobés de paraffine et de méthacrylate. Des coupes ont été colorées avec de l'HES (hématoxyline-éosine-safran). Des études d'immunohistochimie

ont été réalisées sur des coupes déparaffinées ou congelées, en utilisant une technique à l'avidine-biotine-phosphatase alcaline ou par immunofluorescence indirecte.

La différenciation épidermique a été étudiée en utilisant 3 anticorps monoclonaux : anticorps anti-kératine KL1 (Immunotech, Marseille, France) ; AKH1, un anticorps monoclonal contre la profilaggrine/filaggrine humaine (Biomedical Tech. Inc., Soughton, USA), et un anticorps polyclonal de lapin contre l'involucrine (Biomedical Tech.). On a utilisé un anticorps monoclonal de souris contre la microglobuline bêta-2 (Immunotech) comme marqueur d'antigène humain de classe I (16 et 17).

Pour la microscopie électronique par transmission, des échantillons ont été fixés dans 1 % de glutaraldéhyde, 0,5 % de paraformaldéhyde, 0,1 M de tampon phosphate, préfixé dans 1 % de tétroxyde d'osmium, déshydraté dans de l'alcool et enrobé dans un milieu époxy. Des coupes ultrafines sont observées et photographiées avec un microscope électronique à transmission JEOL 1200 EX (18).

Transplantation à une souris athymique.

La technique de greffage est issue de celle décrite précédemment dans la référence bibliographique 19. En bref, 17 souris athymiques congénitalement (Swiss nu/nu, Iffa Credo, Lyon, France) (âgées de 6 à 10 semaines) ont été anesthésiées à l'aide de pentobarbital de sodium, et un siège de greffe circulaire, de 1,5 cm de diamètre, a été préparé sur la face dorso-latérale de chaque animal en retirant délicatement l'épiderme et le derme, tout en laissant le tissu de vascularisation sur la fascia.

Le greffon, dont les bords sont placés sous la peau adjacente de la souris, est recouvert d'une gaze imprégnée de vaseline et d'une capsule en matière plastique (pour 4

souris sur 17) maintenue en place par 4 sutures croisées et protégée par un bandage. Pour 7 autres souris, les capsules en matière plastique sont omises et les greffons sont maintenus en place par un bandage compressif. En variante, 5 pour les 6 souris restantes, les capsules en matière plastique sont remplacées par une chambre de transplantation en silicone (Renner GmbH, Darmstadt, RFA) qui a été placée sur le greffon et qui est maintenue en place par des clips de 9 mm. Après 14, 20 ou 30 jours, le bandage, la capsule et 10 la gaze ont été retirés et les greffons ont été excisés chirurgicalement et préparés pour la microscopie optique ou électronique.

Etude de la membrane basale.

La formation de la membrane basale a été étudiée par 15 immunofluorescence indirecte sur des coupes congelées et par microscopie électronique à transmission.

On a utilisé l'anticorps à la laminine (Institut Pasteur), l'anticorps au collagène de type IV (Institut Pasteur) ou l'anticorps monoclonal de souris au collagène 20 humain de type IV (HEYL) et le sérum de patients atteints de Bullous Pemphigoid (BP) pour détecter les trois composants de la jonction derme-épiderme.

RESULTATS

Le substitut dermique.

25 Le substitut dermique est formé d'une couche poreuse (diamètre des pores : 50 à 100 microns) et fibreuse de collagène de type I et III, de 400 microns d'épaisseur, recouverte d'une couche dense de collagène de type IV/IVox de 10 à 20 microns d'épaisseur.

30 Lorsqu'il est recouvert d'épithélium multicouches, le substitut peut être facilement manipulé sans support.

Par immunofluorescence indirecte, l'anticorps au

collagène de type IV met en évidence une fine couche à la surface de la couche de type I + III et de fins filaments inclus dans la couche de type I + III montrant que le collagène de type IV/IVox a légèrement pénétré dans la
5 couche de type I + III.

Croissance et différenciation in vitro des KHNA.

Les KHNA se fixent rapidement au collagène, s'étendent et se divisent pour former un épithélium confluent. La confluence est obtenue en 3, 4 et 5 jours
10 lorsque l'on ensemence respectivement 10^5 , 5.10^4 et 3.10^4 cellules/cm². Dans un milieu de culture sans sérum, une densité d'ensemencement de 8.10^3 cellules/cm² permet une confluence en 13 jours.

Par des méthodes histologiques et par microscopie
15 électronique, on voit que la différenciation des cellules épidermiques se produit entre le 6ème et le 25ème jours après mise en culture. L'examen histologique après 14 jours de culture montre une feuille épithéliale multicouches formée d'une couche de cellules basales bien organisée et de
20 plusieurs couches de cellules suprabasales comportant plus de cellules aplaties et anucléées. Des grains de kératohyaline clairsemés sont observés dans le cytoplasme des cellules en dessous des couches de cellules anucléées. Lorsque les cultures sont exposées à l'air, on observe une
25 couche cornée épaisse. On observe occasionnellement une parakératose.

Au jour 6, une couche de cellules basales composée de petites cellules cubiques comportant un noyau distinct, des organites cytoplasmiques, des filaments intermédiaires et
30 des tonofilaments, peut être vue au microscope électronique. Cette couche est recouverte de couches suprabasales formées de cellules plus allongées contenant de nombreux organites

et filaments intermédiaires mais pas de grains de kératohyaline. La stratification augmente ensuite avec l'âge de la culture. Les couches de cellules sont étroitement associées avec des desmosomes bien structurés et des espaces inter-cellulaires étroits. Les grains de kératohyaline sont clairsemés, ont une forme arrondie et s'observent dans les couches de cellules intermédiaires supérieures. Ensuite, la stratification n'augmente pas de façon significative mais on peut observer des cellules anucléées et un peu desquamantes.

10 Différenciation in vivo des kératinocytes.

On observe un épiderme bien stratifié seulement dans le cas où les greffons ont été maintenus dans des chambres de greffons en matière plastique ou en silicone inhibant la migration des cellules épidermiques murines. Au jour 14, la couche de collagène I + III du substitut dermique commence à être infiltrée par des cellules inflammatoires et des fibroblastes. Au jour 30, les fibres de collagène de type I + III ne se présentent que par endroits, colonisées par de nombreux fibroblastes et quelques cellules mononucléaires.

20 La dégradation de la couche de collagène de type I + III conduit de façon hétérogène à des fibres de collagène presque intactes dans certaines régions ou à un tissu réorganisé contenant entre autres des fibres de collagène humain éparpillées. La couche de collagène de type IV/IVox

25 reste sensiblement intacte et non infiltrée. Le collagène de type IV/IVox semble donc résistant à la dégradation dans ces conditions occlusives. Lorsque le substitut dermique est greffé dans des conditions non occlusives, sa dégradation est plus rapide. Après la greffe, l'épithélium développe à

30 la fois une couche granulaire et une couche cornée dans les deux semaines. L'épiderme greffé n'est pas hypertrophique comme cela est communément décrit dans le cas d'épithélium

de culture ou de substitut de peau greffés (20 et 21).

Deux semaines après la greffe, on observe de nombreux grains de kératohyaline dans la couche viable supérieure et un stratum corneum avec une faible orthokératose. Au jour 5 20, la microglobuline bêta-2 est exprimée dans la couche de cellules basales et, de façon faible, dans quelques couches suprabasales. Au jour 30, les couches de cellules basales et de cellules suprabasales sont fortement marquées.

Au jour 14, la coloration obtenue avec l'anticorps 10 KLI a été observée pour toutes les couches épidermiques. La couche de cellules basales commence à être partiellement négative au jour 20. Le marquage profilaggrine/filaggrine est limité à la couche granulaire, comme on l'observe pour la peau humaine normale. L'expression d'involucrine se 15 produit en position suprabasale aux jours 14, 20 et 30. Néanmoins, aux jours 30 et 55, cette expression est largement limitée aux couches intermédiaires et supérieures de Malpighi, et aux couches granulaires au jour 30.

Etude de la jonction derme-épiderme.

20 In vitro :

La microscopie électronique montre de nombreuses structures du type hémidesmosome à la jonction entre la couche de collagène de type IV/IVox et les cellules basales ainsi qu'au jour 6 après mise en culture. La jonction 25 derme-épiderme est linéaire, sans crêtes. On observe une plaque intracellulaire opaque aux électrons le long de la membrane de cellules basales dans laquelle s'insèrent des filaments intermédiaires et une couche dense subbasale. On peut distinguer des filaments d'ancrage. La surface du film 30 apparaît comme une ligne dense et une bande opaque aux électrons ressemblant à une lamina densa semble la recouvrir. Cela ressemble à une jonction épiderme-derme dans

la peau d'un foetus humain à un stade intermédiaire du développement.

Par immunofluorescence, l'antigène BP est exprimé à partie du 6ème jour de culture tandis que la laminine qui n'était pas détectable à ce stade peut l'être à partir du 12ème jour. Les deux marqueurs antigéniques s'observent sur la face basale des cellules basales sous forme d'une fluorescence discontinue. La réaction d'immunofluorescence utilisant l'anticorps au collagène de type IV montre une fluorescence sur toute l'épaisseur de la couche de collagène de type IV/IVox.

In vivo :

Aux jours 30 et 55 après la transplantation, la structure fine de la membrane basale est plus nette qu'en culture in vitro puisque le collagène IV/IVox apparaît moins dense. De nombreux hémidesmosomes bien différenciés et une lamina densa sont mis en évidence. Dans certaines régions, la couche de collagène de type IV/IVox semble partiellement dégradée par les cellules épidermiques. Dans ces régions, au 30ème jour, des filaments d'ancrage peuvent apparaître sous la lamina densa. Au 55ème jour, le tissu conjonctif sous la lamina densa est mieux organisé et les filaments d'ancrage sont bien structurés. En microscopie optique, la jonction derme-épiderme apparaît légèrement ondulée et, en microscopie électronique, l'interface derme-épiderme des cellules basales forme une membrane plasmique ondulée dans sa partie basale.

La qualité de l'épiderme obtenu permet d'appliquer le matériau aux tests d'évaluation toxicologiques, pharmacologiques, et cosmétologiques, selon les procédures usuelles pratiquées sur des biopsies de peau humaine et animale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

1. Green H., Kehinde O. & Thomas J., Proc. Natl. Acad. Sc., USA 76 (1979) 5665
2. Boyce S. & Ham RG., J. Invest. Dermatol. 81 (1983) 33s
3. Hennings H., Michael D., Cheng C., Steward S., Holbrook K. & Yuspa SH., Cell 19 (1980) 245
4. Asselineau D., Bernard B., Bailly C. & Darmon M. Exp. Cell. Res. 159 (1985) 536
5. Bell E., Sher S., Hull B., Merrill C., Rosen S., Chamson A., Asselineau D., Dubertret L., Coulomb B., Lapiere C., Nusgens B. & Neveux Y., J. Invest. Dermatol. 81 (1983) 2s
6. Coulomb B., Saiag GP., Bell E., Breitburd F., Lebreton C., Heslan M. & Dubertret T., Br. J. Dermatol. 114 (1986) 91
7. Prunieras M., Regnier M. & Woodley D., J. Invest. Dermatol. 81 (1983) 28s
8. Regnier M., Desbas C., Bailly C. & Darmon M., In vitro 24 (1988) 625
9. Regnier M. & Darmon M., In vitro, 25 (1989) 1000
10. Lenoir M-C., Bernard B., Pautrat G., Darmon M. & Shroot B., Dev. Biol. 130 (1988) 610
11. Freeman AE., Igel HJ., Herman BJ & Kleinfeld KL., In vitro 12 (1976) 352
12. Yannas IV. & Burke JF., J. Biomed. Mater. Res. 14 (1980) 65
13. Boyce S. & Hansbrough J., Surgery 103 (1988) 421
14. Hirone T. & Taniguchi S., Cur. Prob. Dermatol. 10 (1980) 159
15. Chamson A., Germain N., Claudy A., Perier C. &

- Frey J., Arch. Dermatol. 281 (1989) 267
16. Forsum U. & Tjemplund UM., Acta Venereol (Stockh) 57 (1977) 121
17. Mauduit G., Vincent CL., Gielen V., Faure M., Demiden A. & Thivolet J., Tissue antigens 29 (1987) 65
18. Garrone R. & Tiollier J., dans Bienvenu, Grimaud, Laurent, Walterde, Gruyter (Eds), Marker proteins, vol. 3 1986. pp 357-361
19. Tinois E., Faure M., Kanitakis J., Ramirez-Bosca A., Nguyen C., Tardy M., Tayot JL. & Thivolet J., Epithelia 1(1987) 141
20. Faure M., Mauduit G., Schmitt D., Kanitakis J., Demidem A. & Thivolet J., Br. J. Dermatol. 116 (1987) 161
21. Ramirez-Bosca A., Tinois E., Faure M., Kanitakis J., Roche P. & Thivolet J., J. Invest. Dermatol. 91 (1988) 36
22. Murray JC., Stingl G., Kleinman HK., Martin GR. & Katz SI., J. Cell. Biol. 80 (1979) 197
23. Kleinman HK., Murray JC., Mc Goodwin EB. & Martin GR., J. Invest. Dermatol. 71 (1978) 9
24. Woodley D., Kimberly C. & O'Keefe J., J. Invest. Dermatol. 94 (1990) 139.

REVENDICATIONS.

1. Biomatériau a base de collagène, caractérisé en ce qu'il comporte, intimement associés, un support ou substitut dermique à base de collagène de type IV et un épithélium
5 épidermique à cellules différenciées obtenu par culture de cellules epidermiques sur ledit support ou substitut dermique.

2. Biomateriau selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support ou substitut dermique comporte en outre
10 une sous-couche d'au moins un autre type de collagene.

3. Biomatériau selon la revendication 2, caractérise en ce que ladite sous-couche comporte des collagènes des types I et III.

4. Biomateriau selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les cellules épidermiques sont des kératinocytes.

5. Biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les collagenes sont des collagènes natifs ou réticules ou des mélanges de
20 collagene natif et de collagene réticule.

6. Application du biomatériau selon l'une quelconque des revendications 1 a 5 dans un test d'évaluation in vitro en toxicologie, pharmacologie ou cosmétologie.

7. Biomatériau de protection des plaies et brûlures
25 ou formant agent de cicatrisation, selon l'une quelconque des revendications 1 a 5.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00773

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) * According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl ⁵ : C12N 5/08 A61L 15/32 A61L 27/00																	
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black;">Classification System</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl⁵</td> <td style="padding: 5px;">C12N A61L</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl ⁵	C12N A61L											
Classification System	Classification Symbols																
Int.Cl ⁵	C12N A61L																
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT * <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Category *</th> <th style="border-bottom: 1px solid black;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">The Journal of Investigative Dermatology, volume 95, No. 3, September 1990, (Baltimore, PA, US) M.S. Wilke et al.: "Human keratinocytes adhere to a unique heparin-binding peptide sequence within the triple helical region of type IV collagen", see pages 264-270 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">WO, A, 8908467 (IMEDEX) 21 September 1989, see claims 1,6,8,9,12; example 11 (cited in the application) ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">Biological Abstracts, volume 84, No. 9, 1987, (Philadelphia, PA, US) E.M. Tinois et al.: "Growth and differentiation of human keratinocytes on extracellular matrix", & Arch. Dermatol. Res., 279(4): 241-246, 1987, see page AB-564, abstract No. 88152 ---</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">WO, A, 8903392 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 20 April 1989, see claims 11-15; page 4, lines 24-34; page 19, lines 8-21; page 20, lines 14-35 --- ./.</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-7</td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	The Journal of Investigative Dermatology, volume 95, No. 3, September 1990, (Baltimore, PA, US) M.S. Wilke et al.: "Human keratinocytes adhere to a unique heparin-binding peptide sequence within the triple helical region of type IV collagen", see pages 264-270 ---	1-7	Y	WO, A, 8908467 (IMEDEX) 21 September 1989, see claims 1,6,8,9,12; example 11 (cited in the application) ---	1-7	Y	Biological Abstracts, volume 84, No. 9, 1987, (Philadelphia, PA, US) E.M. Tinois et al.: "Growth and differentiation of human keratinocytes on extracellular matrix", & Arch. Dermatol. Res., 279(4): 241-246, 1987, see page AB-564, abstract No. 88152 ---	1-7	A	WO, A, 8903392 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 20 April 1989, see claims 11-15; page 4, lines 24-34; page 19, lines 8-21; page 20, lines 14-35 --- ./.	1-7
Category *	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³															
Y	The Journal of Investigative Dermatology, volume 95, No. 3, September 1990, (Baltimore, PA, US) M.S. Wilke et al.: "Human keratinocytes adhere to a unique heparin-binding peptide sequence within the triple helical region of type IV collagen", see pages 264-270 ---	1-7															
Y	WO, A, 8908467 (IMEDEX) 21 September 1989, see claims 1,6,8,9,12; example 11 (cited in the application) ---	1-7															
Y	Biological Abstracts, volume 84, No. 9, 1987, (Philadelphia, PA, US) E.M. Tinois et al.: "Growth and differentiation of human keratinocytes on extracellular matrix", & Arch. Dermatol. Res., 279(4): 241-246, 1987, see page AB-564, abstract No. 88152 ---	1-7															
A	WO, A, 8903392 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 20 April 1989, see claims 11-15; page 4, lines 24-34; page 19, lines 8-21; page 20, lines 14-35 --- ./.	1-7															
* Special categories of cited documents: ¹⁰ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family															
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search 13 December 1991 (13.12.91) </td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report 13 January 1992 (13.01.92) </td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> International Searching Authority European Patent Office </td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search 13 December 1991 (13.12.91)	Date of Mailing of this International Search Report 13 January 1992 (13.01.92)	International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer											
Date of the Actual Completion of the International Search 13 December 1991 (13.12.91)	Date of Mailing of this International Search Report 13 January 1992 (13.01.92)																
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer																

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	Experimental Cell Research, volume 193, 1991, Academic Press (Duluth, Minn., US) E. Tinois et al.: "In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute", see pages 310-319 -----	1-7

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

FR 9100773

SA 51914

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 11/02/92. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8908467	21-09-89	FR-A- 2628634	22-09-89
		EP-A- 0357755	14-03-90
		JP-T- 3503371	01-08-91

WO-A- 8903392	20-04-89	US-A- 4876332	24-10-89
		EP-A- 0380546	08-08-90
		JP-T- 3500492	07-02-91
		US-A- 5007925	16-04-91

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 91/00773

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Int.C1.5 C 12 N 5/08 A 61 L 15/32 A 61 L 27/00		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
Int.C1.5	C 12 N A 61 L	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	The Journal of Investigative Dermatology, volume 95, no. 3, septembre 1990, (Baltimore, PA, US) M.S. Wilke et al.: "Human keratinocytes adhere to a unique heparin-binding peptide sequence within the triple helical region of type IV collagen", voir pages 264-270 ---	1-7
Y	WO,A,8908467 (IMEDEX) 21 septembre 1989, voir revendications 1,6,8,9,12; exemple 11 (cité dans la demande) ---	1-7
Y	Biological Abstracts, volume 84, no. 9, 1987, (Philadelphia, PA, US) E.M. Tinois et al.: "Growth and differentiation of human keratinocytes on extracellular matrix", & Arch. Dermatol. Res., 279(4): 241-246, 1987, voir page AB-564, abrégé no. 88152 ---	1-7
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
13-12-1991	13 JAN 1992	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	MISS T. TAZELAAR	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	WO, A, 8903392 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA) 20 avril 1989, voir revendications 11-15; page 4, lignes 24-34; page 19, lignes 8-21; page 20, lignes 14-35 ---	1-7
P, X	Experimental Cell Research, volume 193, 1991, Academic Press (Duluth, Minn., US) E. Tinois et al.: "In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute", voir pages 310-319 -----	1-7

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100773
SA 51914

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 11/02/92
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8908467	21-09-89	FR-A- 2628634	22-09-89
		EP-A- 0357755	14-03-90
		JP-T- 3503371	01-08-91

WO-A- 8903392	20-04-89	US-A- 4876332	24-10-89
		EP-A- 0380546	08-08-90
		JP-T- 3500492	07-02-91
		US-A- 5007925	16-04-91

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82